

B5

Method for the detection of microsatellite instability and its use in the diagnosis of tumors

Publication number: EP0869188

Publication date: 1998-10-07

Inventor: DIETMAIER WOLFGANG DR (DE); RUESCHOFF JOSEF PROF (DE); FISHEL RICHARD PROF (US)

Applicant: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)

Classification:

- international: G01N33/50; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/50; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68

- European: C12Q1/68M; C12Q1/68M6B

Application number: EP19980105294 19980324

Priority number(s): DE19971012332 19970325

Also published as:



US6150100 (A1)



JP10323199 (A)

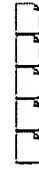


EP0869188 (A3)

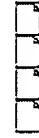


DE19712332 (A1)

Cited documents:



WO9419492



WO9425625



US5582979



XP002199551



XP002199552

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract of EP0869188

Method for analysing micro-satellite loci comprises: (a) isolating genomic DNA from human biological material; (b) amplifying five different micro-satellite loci using five different primer pairs, where the loci include two mononucleotide repeat loci, one or two dinucleotide repeat loci of class 2a, one or two dinucleotide repeat loci of class 2b and optionally a pentanucleotide repeat locus; and (c) determining the size of the amplification products.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database - Worldwide



⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 197 12 332 A 1

⑩ Int. Cl. 6:
C 12 Q 1/68
// G01N 33/574

⑪ Aktenzeichen: 197 12 332.5
⑫ Anmeldetag: 25. 3. 97
⑬ Offenlegungstag: 1. 10. 98

DE 197 12 332 A 1

⑭ Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim,
DE

⑭ Erfinder:

Dietmaier, Wolfgang, Dr., 93049 Regensburg, DE;
Rüschoff, Josef, Prof., 93077 Bad Abbach, DE;
Fisher, Richard, Prof., Penn Valley, Pa., US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Verfahren zum Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität zur Tumordiagnostik

⑯ Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung genomischer Instabilität an 5 ausgewählten Mikrosatelliten Loci. Die Analyse dieser ausgewählten Loci ist geeignet zur Erstellung von prognostischen Tumordiagnosen, zur Analyse von erblicher Tumorprädisposition sowie zur Tumorfürlicherkennung. Besondere Bedeutung hat diese Methode bei der Diagnose von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, beispielsweise Colorektaltumoren.

DE 197 12 332 A 1

Beschreibung

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Kit zur prognostischen Diagnostik, Prädispositionsdagnostik bzw. Früherkennung von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, Vorzugsweise Colorektaltumoren. Grundlage dafür bildet der Nachweis genomischer Instabilität von sogenannten Mikrosatelliten mit Hilfe von PCR.
- Mikrosatelliten (MIS) sind kurze Tandem Repeats, die über das gesamte menschliche Genom verteilt vorkommen. Statistisch treten Mikrosatelliten etwa einmal in 1000 Basenpaaren auf. Bisher sind 5 Klassen von MIS beschrieben, die sich nach der Länge ihrer kleinsten repetitiven Einheit als Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, oder Pentanukleotid-Repeat unterscheiden. In der Regel treten diese repetitiven Einheiten 10 bis 40 mal in Tandemanordnung wiederholt auf.
- Mikrosatelliteninstabilität (MIN) ist in Form kleiner Deletionen oder Insertionen kaum bei vielen Tumorpatienten nachgewiesen werden, wenn man DNA aus Tumormaterial mit normaler DNA des gleichen Individuums vergleicht (Thibodeau et al. (1993), *Science*, 260, 816-819) (WO 94/19492). Dies geschieht durch Amplifikation der DNA mit Hilfe von PCR und anschließender gelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikationsprodukte. Als Ursache für MIN wird ein dauerhafter Replikationsdefekt der Tumorzellen angesesehen (Parsons et al., (1993), *Cell*, 75, 1227-1236; Shibata et al., (1994) *Nat. Genet.*, 6, 273-281). Solche Tumoren werden als "Replikation-Lerror-Positive" (RER+) klassifiziert. Ein RER+ Phänotyp ist charakteristisch für Colorektaltumoren in Familien mit HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer) (Aaltonen et al. (1993), *Science*, 260, 812-816).
- Die Analyse von Mikrosatelliten ist eine äußerst attraktive Methode sowohl für diagnostische Anwendungen als auch für die Untersuchung der Tumorgenese von RER+ Tumoren. Aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit ist die Bestimmung der MIN vor der Sequenzierung der Mismatch Repair Gene in HNPCC Familien ein geeignetes Hilfsmittel zur Identifizierung potentieller RER+ Patienten. Ebenfalls von großer Bedeutung ist die MIN Analyse als prognostische Diagnose bei sporadischem Colorectal-Karzinom, weil das Auftreten von MIN mit einer besseren Prognose korreliert (Lothe et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5849-5852; Thibodeau et al. (1993), *Science*, 260, 816-819; Bubb et al. (1996) *Oncogene*, 12, 2641-2649).
- MIN kann in mehr als 90% aller HNPCC Tumoren nachgewiesen werden (Liu et al., (1996) *Nature Med.*, 2, 169-174), wohingegen MIN in sporadischen Colorektaltumoren nur mit einer Häufigkeit von 10-20% auftritt (Thibodeau et al. (1993) *Science*, 260, 816-819; Ionov et al. (1993), *Nature*, 363, 558-561; Aaltonen et al. (1993) *Science*, 260, 812-816; Lothe et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5849-5852). MIN ist jedoch nicht auf Colorektaltumoren beschränkt, sondern wurde auch in anderen Tumoren nachgewiesen. Dazu zählen unter anderem Pankreaskarzinome (Han et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5087-5089), gastrische Karzinome (Han et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5087-5089; Pelomaki et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5853-5855; Mironov et al. (1994) *Cancer Res.*, 54, 41-44; Rhyu et al. (1994) *Oncogene*, 9, 29-32; Chong et al. (1994) *Cancer Res.*, 54, 4595-4597), Prostata-Karzinome (Gao et al. (1994) *Oncogene*, 9, 2999-3003), Karzinome des Endometriums (Riesinger et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5100-5103; Pelomaki et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5853-5855) und Mammakarzinome (Patel et al. (1994) *Oncogene*, 9, 3695-3700).
- Der Mechanismus der Tumorgenese von RER+ Tumoren ist nicht im Detail bekannt. Bisher wurden fünf Gene identifiziert, deren Defekt zu einem Auftreten des RER+ Phänotyps führen kann. Da in HNPCC Familien sowohl für hMLH1 (Broonker et al. (1994) *Nature*, 368, 258-261) als auch für hMSH2 (Fischel et al. (1993) *Cell*, 75, 1027-1038; Leach et al. (1993) *Cell*, 75, 1215-1225) genetische Variabilitäten mit einer Häufigkeit von über 30% nachgewiesen wurden, spielen diese beiden Gene offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von MIN. 2 andere Mismatch Repair Gene, hPMS1 und hPMS2 sind in weniger als 5% aller HNPCC Patienten mutiert, so daß diese Gene wohl eine eher untergeordnete Rolle in RER+ Tumoren spielen. Es ist jedoch davon auszugehen, daß noch weitere, bisher unbekannte Gene an einem effektiven Mismatch Repair beteiligt sind.
- Es besteht Grund zu der Annahme, daß MIN eine direkte Rolle bei der Tumorgenese dadurch spielt, daß aufgrund von Defekten im Mismatch Repair System Mikrosatelliten im kodierenden Bereich von Genen mutiert werden, die für die Regulation der Zellproliferation von Bedeutung sind. Beispielsweise wurde ein Repeat von 10 Deoxyadenosinen im kodierenden Bereich des α -Gif-beta1-Rezeptor Gens als MIN-Target identifiziert (Markowitz et al., (1995) *Science*, 268, 1336-1338). Ein weiteres MIN-Target, das α -Gif- β 1-Gens, ist in gastrointestinalen Tumoren innerhalb seiner kodierenden Region an einem (G)_n Repeat mutiert (Souza et al. (1996) *Nat. Genet.*, 14, 255-257). Interessanterweise waren nur 10% aller untersuchten Tumoren mit MIN in beiden Genen mutiert. In anderer (G)_n MIS innerhalb eines β -Tiston-Gens war in keinem der untersuchten Tumoren mutiert (Souza et al. (1996) *Nat. Genet.*, 14, 255-257). Darüber hinaus konnte MIN bisher nur an einem Teil der untersuchten Loci nachgewiesen werden. Ob und inwieweit sich Mikrosatelliten, deren Instabilität bereits nachgewiesen wurde, hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von MIN unterscheiden, war zum Zeitpunkt der Erfindung nicht bekannt.
- Vielmehr existieren für die Wahl von geeigneten Loci zur Analyse von MIN derzeit keine weiteren Anhaltspunkte. Es ist somit nicht bekannt, ob und wenn ja, welche Loci sich am besten zur eindeutigen Bestimmung von RER+ Phänotypen eignen. Stand der Technik hingegen ist die Analyse von 4 bis 7 zufällig ausgewählten Loci zur Klassifikation des MIN Status beispielsweise in Colorektalkarzinosen (z. B. Aaltonen et al. (1993) *Science*, 260, 812-816; Thibodeau et al. (1993) *Science*, 260, 816-819; Lothe et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5849-5852; Kim et al. (1994) *Am. J. Path.*, 145, 148-156; Bubb et al. (1996) *Oncogene*, 12, 2641-2649; Plummer and Cascy, (1996) *Nat. Med.*, 2, 156-158).
- Am häufigsten wurden dabei Mono- und Dinukleotid-Loci analysiert. Dinukleotid-Repeat Loci lassen sich in diesem Zusammenhang in 2 verschiedene Klassen einteilen:
- Nicht-komplexe Loci, welche innerhalb der zu amplifizierenden Region außer dem Dinukleotid Repeat keine weiteren repetitiven Elemente aufweisen (Klasse 2a). Zu diesen Loci gehören APC, D13S175, D3S1283, Mfd26, Mfd28 und Mfd41.
- Komplexe Loci, bei denen neben dem Dinukleotid-Repeat noch weitere repetitive Sequenzen auftreten (Klasse 2b). Zu diesen Loci gehören Mfd15, D10S197, D11S1318, D11S904, D18S69, D2S123, D9S171 sowie 1TPS3PCR.

DE 197 12 332 A 1

Darüber hinaus wurden auch Mononukleotid-Repeat Loci aufgrund ihrer guten Amplifizierbarkeit sowie ihrer eindeutigen gelektrophoretischen Signale mehrfach untersucht (Iiu et al. (1996) *Nature Med.*, 2, 169-174; Augenlicht et al. (1996) *Oncogene*, 12, 1767-1772; Plummer and Casey, (1996) *Nat. Med.*, 2, 156-158).

Grundlage der Erfindung war somit die Suche nach polymorphen Loci, deren Analyse eine zuverlässige Aussage über die allgemeine Tendenz zur genomischen Instabilität zuläßt. Dagegen konnten an unterschiedlichen Mikrosatelliten, an denen bereits nach dem Stand der Technik MIN gefunden wurde, unterschiedliche Häufigkeiten polymorpher Veränderungen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß in unterschiedlichen Patienten verschiedene Klassen von Mikrosatelliten mit unterschiedlicher Häufigkeit von genomischer Instabilität betroffen sind. Daraus folgt, daß für eine zuverlässige Bestimmung des RER Phänotyps mit einer begrenzten Anzahl an PCR-Reaktionen eine Analyse verschiedener Klassen von MIN unabdingbar ist.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein tumordiagnostisches Verfahren zur Analyse von Mikrosatelliten-Loci, bestehend aus folgenden Schritten:

- a) Isolierung von genomischer DNA aus humanem biologischem Material
- b) DNA-Amplifikation von 5 verschiedenen Mikrosatelliten-Loci mit Hilfe von jeweils fünf verschiedenen Primerpaaren, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu amplifizierenden Loci um zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und 0 bis 1 Pentanukleotid-Repeat Locus handelt.
- c) Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte

Als vorteilhaft hat sich dabei insbesondere eine Ausführungsform erwiesen, bei der die 5 zu analysierenden Mikrosatelliten-Loci ausgewählt werden aus einer Gruppe von Loci bestehend aus: BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69, und TPS3Alu. Als besonders vorteilhaft hat sich eine spezielle Ausführungsform erwiesen, bei denen zur Analyse von 5 dieser Loci 5 Primerpaare aus einer Gruppe von Primern, repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 43 und 46, ausgewählt werden.

In einer speziellen Ausführungsform werden die 5 Loci BAT26, BAT40, APC, Mfd15 und D2S123 analysiert. Dabei können 1 oder mehrere Primerpaare entsprechend den SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, 36 verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Anwendung dieses Verfahrens zur Bestimmung des RER Phänotyps, dadurch gekennzeichnet, daß bei fehlendem Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei allen 5 untersuchten Loci von einem RER- Phänotyp und bei Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei mehr als einem Locus von einem RER+ Phänotyp ausgegangen wird.

Eine besondere Ausführungsform besteht in der Anwendung des Verfahrens zur prognostischen Diagnose von Tumoren, vorzugsweise bei Tumoren des Endometriums, des Gastrointestinaltraktes und insbesondere bei Colorektatumoren.

Eine andere besondere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens zur Diagnose einer familiären Tumor-Prädisposition, vorzugsweise für Tumoren des Endometriums, des Gastrointestinaltraktes und insbesondere für Colorektatumoren.

Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität in disseminierten Tumorzellen.

Eine zusätzliche Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens vor einer Entscheidung, welche Art von Chemotherapie für einen Patienten eingesetzt werden soll. Dies ist von Bedeutung, da die Durchführung von Chemotherapien häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist, so daß ein für bestimmte Arten von Tumoren unwirksamer Einsatz eines solchen Therapeutikums nach Möglichkeit zu vermeiden ist.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, mindestens bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und 0 bis 1 Pentanukleotid-Repeat Locus geeignet sind.

Eine besondere Ausführungsform des Kits beinhaltet mindestens 5 Primerpaare, die zur Amplifikation von 5 Loci, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69 und TPS3Alu, geeignet sind. Vorzugsweise besitzen diese Primer Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 43 und 46.

Eine spezielle Ausführungsform des Kits beinhaltet mindestens 5 Primerpaare zur Analyse von BAT26, BAT40, APC, Mfd15, und D2S123 nachgewiesen. Dabei können 1 oder mehrere Primerpaare Sequenzen entsprechend den SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, 36, ... aufweisen.

Zusätzlich zu den 5 Primerpaaren können diese Kits weitere Primerpaare sowie molekularbiologische Reagenzien und Materialien enthalten, die der erfundungsgemäßen Durchführung von MIN Analysen dienen.

Als Quelle zur Gewinnung von genomischer DNA kann je nach Aufgabenstellung unterschiedliches biologisches Material analysiert werden. Für die prognostische Diagnostik sowie für die Diagnostik einer familiären Prädisposition wird dem Patienten entnommene Tumorgewebe verwendet. Bei der Anwendung des erfundungsgemäßen Verfahrens zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von MIN in disseminierten Tumorzellen wird die DNA aus zellulären Bestandteilen enthaltenden Körperflüssigkeiten oder Körperausscheidungen wie zum Beispiel Blut, Serum, Plasma, Urin oder Stuhl isoliert.

In der Regel wird eine Kontrollreaktion mit einer DNA durchgeführt, deren Sequenz dem "gesunden" Wild-Typ des zu analysierenden Mikrosatelliten-Locus entspricht. Besonders geeignet ist genomische DNA die aus gesundem, nicht tumorigen Gewebe desselben Individuums isoliert wurde.

Die Isolierung genomischer DNA aus Formalin-gefärbtem und in Paraffin eingebettetem Gewebe erfolgt folgendermaßen:

Aufzertigung von 5 µm-Schichten mit Mikrotom. Aufziehen auf einen Objekträger

DE 197 12 332 A 1

- Deparaffinierung:
 Inkubation der Objekträger bei 65°C. 1 Stunde
 "Durchziehen" durch Alkoholreihe: 2x15 min in Xylol
 2x15 min in EtOH(abs.)
 2x15 min in EtOII (96%)
 2x15 min in EtOII (70%) (mehrere Wochen in 70% EtOII haltbar)
 Überführen der Objekträger in Wasser
 Abtrönen des Gewebes im feuchten Zustand mit Skalpell, Glaskapillare, u. a. (Mikrodisektion), überführen in 0,5 ml Reaktionsgefäß

10 - Zugabe von 20-50 µl Digestion-Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
 5% Tween 20
 1 mM EDTA
 Zugabe von 7-15 µl Proteinase K (20 mg/ml) (entspricht 30-50% des vorgegebenen Volumens)
 - Inkubation bei 50°C im Thermoblock mit Heizdeckel bis Lösung klar ist (über Nacht)

15 - Inaktivierung der Proteinase K: 15 min 94°C.

Fakultativ kann eine weitere Aufreinigung der DNA mit dem Quiagen tissue DNA Kit der Firma Quiagen erfolgen. Zur Analyse des biologischen Materials wurden die PCR Ansätze nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

	Master Mix		Reaktion
	µl	End konz.	
20 H2O	37,25		
25 DMSO	2,5	5%	100%
30 10 x Expand-HiFi-Buffer (BM)	5	1 x	10 x
35 dNTPs	1,0	0,2 mM	10 mM
Primer 1:	1,0	0,3 µM	15 µM
Primer 2:	1,0	0,3 µM	15 µM
Taq-Pol. Expand HiFi-Pol (BM)	0,25	1,25 U	5 U
total	48		
hinzufügen:		48 µl Rk.-Mix zu	2 µl template DNA

Alternativ wurden in einer Duplex- bzw. Multiplexanalyse auch 2 oder mehrere Loci in einem Reaktionsansatz zusammen analysiert, sofern deutlich voneinander unterscheidbare Fragmentgrößen zu erwarten waren. Dazu wurden 2 oder mehrere Primerpaare mit einer gleichen Endkonzentration von 0,3 µM je Primer eingesetzt.

Die PCR-Amplifikationen wurden unter Standardbedingungen mit 100 ng gereinigter genomicscher DNA in einem MJ Research Thermocycler (P1C100, MJ Research, Watertown, MA) mit folgenden Zyklen durchgeführt:

45 94°C 3 min (einmalige Denaturierung)

35 Zyklen:

94°C 1 min

Annealingstemperatur 50-68°C. 1 min

entsprechend Abb. 1

50 72°C 1 min

72°C 8 min.

Ausschließlich wurden die PCR-Produkte auf einem denaturierenden, 6,7%igen Polyacrylamidgel mit 50% Harnstoff für etwa eine Stunde bei 1800 Volt und 55°C in einer SequiGen Sequenzgelskammer (BioRad, Hercules, CA) aufgetrennt und mit Silbernitrat (Budowle et al., (1991) Am. J. Hum. Genet., 48, 137-144) in einem modifizierten Färbebad (Bender et al., (1994) Biotechniques, 16, 204-206) angefärbt (Schlegl et al., (1995) Virchows Archiv, 426: 223-227).

Polyacrylamidgelclicktrophoresis zur Auftrennung der PCR Banden

60 (6,7%iges PA-6M Harnstoffgel. Vertikalapparatur sequi-GenGT, BioRad)

3 µl PCR-Produkt

3 µl Loading buffer (10 ml Formamid)

65 10 mg Xylol-Cyanol

10 mg Bromophenolblau

200 µl EDTA, 0,5M

Denaturierung, 94°C, 5 min.

15 min PA-Gelvorauf bei 2300 V (bis 55°C erreicht ist)

DE 197 12 332 A 1

- Beladen des PA-Gels
- 45-75 min Laufzeit bei 1800 V 55°C

Dektion der aufgetrennten PCR-Produkte durch Silberfärbung

5

Wärmeaustauschplatte vom PA-Gel (zwischen Wärmeaustauschplatte und Glasplatte) abziehen und Plexiglas-
färberahmen auf das PA-Gel (zu: Glasplatte liegend) legen und mit Klammern fixieren.

- Zugabe von folgenden Lösungen:

H₂O: kurz spülen

10

10% Ethanol: 10 min

1% Salpetersäure: 3 min

H₂O: spülen

15

0,012 M Silbernitrat: 20 min

H₂O: spülen

15

0,28 M Na₂CO₃/0,019% Formalin: spülen

0,28 M Na₂CO₃/0,019% Formalin: 3-6 min (bis Bänder sichtbar)

10% Essigsäure: 3 min

H₂O: 3 min

20

- Färberahmen entfernen

- Whatman 3MM Papier auf PA-Gel legen und damit PA-Gel von Glasplatte abziehen

20

- PA-Gel mit Frischhaltesolie bedecken und 1 h im Gelrockner (GelDryingSystem, ioral) trocknen (so behandelte
Gels sind praktisch unbegrenzt haltbar).

DNA aus 27 Patienten mit Colorectalkarzinom wurde an 25 verschiedenen MIS-Loci auf MIN untersucht. Das ausgewählte Patientenkollektiv wurde aus einer Gruppe von 200 Patienten vorselektiert, bei denen in einer früheren prospektiven Studie 5 MIS Loci analysiert worden waren (APC, D9S 171, TP 53, D13S175, D11S904). Bei diesen 27 Patienten war in 5 Fällen MIN an mindestens 2 Loci nachgewiesen worden, 5 weitere Fälle zeigten Instabilität an einem Locus und traten daher als "lowMIN+" klassifiziert werden.

25

In 17 Fällen konnte keine Instabilität nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden eine MIS-stabile Zelllinie (SW480) und eine Zelllinie mit RER+Phänotyp (HCT116), welche einen Defekt im hMSH2 Mismatch Repair Gen aufweist, mit dem Tumormaterial verglichen.

30

Für eine detailliertere Analyse des MIN-Status dieser Tumoren wurde die MIS-Analyse auf insgesamt 25 MIS Loci ausgedehnt. Vertreter aller sechs unterschiedlichen Repeat-Typen wurden analysiert: 3 Mononukleotid-Repeat Loci (BAT 25, BAT 26, BAT 40), 6 CA-Dinukleotid-Repeats der Klasse 2a (APC, D13S175, D3S1283, Mfd26, Mfd28 und Mfd41), 8 Diakukleotid-Repeats der Klasse 2b (Mfd15, D10S197, D11S1318, D11S904, D18S69, D2S123, D9S171, TPS31PCR), zwei Loci mit Triakukleotid-Repeats (AR, TBP), drei Loci mit Tetranukleotid-Repeats (IPRI, MYCL 1, RB), und zwei Loci mit Pentanukleotid-Repeats (FMR2, TPS31a). Die genauen Sequenzen dieser Repeats wurden entweder der GenBank Datenbank entnommen oder durch Direktesequenzierung von PCR-Präzliketten überprüft. Abb. 1 gibt einen Überblick über die analysierten Loci sowie die jeweils zur Amplifikation verwendeten Primer, deren Sequenzen in SEQ ID NOS. 1-50 wiedergegeben sind. Abb. 2a zeigt exemplarisch Amplifikationen unterschiedlicher Allele aller 25 untersuchten Genloci. Abb. 2b zeigt exemplarisch eine Duplexanalyse der Loci BAT40 und D3S1283. Bei Auftritt eines Verlustes von Allelen durch tumorbedingten Heterozygotitäts-Verlust (loss of heterozygosity, LOH) (LiMao et al., 1996, Science, 271, 659-662) wurde das Ergebnis der jeweiligen PCR in dieser Studie nicht mitberücksichtigt.

35

40

45

Identifikation von RER+ Tumoren

50

Um abzuklären, welche Tumoren mit Sicherheit als RER+ klassifiziert werden können und um zu untersuchen, ob einige Tumoren als "schwach RER+" eingestuft werden müssen, wurden die verschiedenen Tumoren untereinander verglichen. Nach dem Stand der Technik existiert derzeit keine einfache Methode nach dem "entweder oder" Prinzip zur eindeutigen Klassifizierung eines Tumors als RER+ oder RER-. Das vorselektierte Kollektiv von 27 Colorectumtumorträgeren, von denen ursprünglich 17 als RER-, 5 als RER+ und 5 als "lowMIN+" diagnostiziert wurden, ergab nach Analyse weiterer Loci ein wesentlich differenzierteres Bild bezüglich der Verteilung von MIN.

55

Wie in den Abb. 3 und 4a dargestellt, kommen 3 Tumoren mit einer MIN-Rate von mehr als 50% (14MIN/24 Loci, Nr. 1, 8 und 16), ein Tumor mit 42% (10MIN/24 Loci, Nr. 5), ein Tumor mit 38% (9MIN/24 Loci, Nr. 2) und ein Tumor mit 29% (7MIN/24 Loci, Nr. 13) nachgewiesen werden. Damit besitzen all diese Tumoren als getneinsames Kriterium eine Instabilitätsfrequenz von über 25% der analysierten Loci. Deshalb wurden diese insgesamt 6/27 Tumoren als eindeutig RER+ klassifiziert.

55

Darüber hinaus wurden 8 zusätzliche Tumoren identifiziert, die 1 bis 2 MIN-Ergebnisse aufwiesen ($\alpha=8$, MIN-Frequenz $\leq 8\%$) und daher als "lowMIN+" klassifiziert wurden. Im Vergleich zu der früheren Studie, bei der nur 5 anstatt 25 MIS Loci analysiert wurden, konnten durch die neue Studie nur 13 anstatt vorher 17 Fälle als RER- klassifiziert werden. Dieses Ergebnis, erzielt durch eine Ausweitung der Analyse auf 25 MIS-Loci, unterscheidet sich damit grundsätzlich von früheren Studien nach dem Stand der Technik und verdeutlicht das Problem einer unzuverlässigen RER-Klassifikation, wenn für eine solche Klassifikation eine kleine Anzahl an MIS Loci zufällig ausgewählt wird. In diesem Zusammenhang ist allerdings von besonderer Bedeutung, daß kein Tumor mit einer mittleren Instabilität an 3 bis 6 Loci entsprechend einem Prozentsatz von 10-25% nachgewiesen werden konnte, so daß bei einer MIN Rate von über 25% eine RER+ Klassifikation eindeutig vorgenommen werden kann.

60

65

DE 197 12 332 A 1

Unterschiedliche MTS Loci zeigen unterschiedliche MIN-Häufigkeiten

Insgesamt waren in 14 der 27 untersuchten Tumoren Mikrosatelliten von Instabilität betroffen. Wie erwartet, trat MIN dabei in einigen Tumoren vermehrt auf; zusätzlich wurden jedoch auch einzelne Ereignisse an MIN in weiteren Tumoren nachgewiesen. Um zu ermitteln, ob MIN-Häufigkeit vom Repeat-Typus abhängt, wurden die MIN-Frequenzen für jeden Repeat-Typ separat ermittelt und mit der durchschnittlichen MIN-Frequenz der Gesamtheit der getesteten Mikrosatelliten verglichen: Die durchschnittliche MIN-Rate bezogen auf alle pro Patient untersuchten Loci betrug 11,4% (78 MINs/25 Loci=3,1 MIN/Locus; durchschnittliche MIN Rate = 3,1/27 Patienten 11,4%). Die durchschnittlichen Frequenzen innerhalb der einzelnen Repeat-Typen waren dagegen unterschiedlich: sämtliche Mononukleotid-Repeats waren überdurchschnittlich oft verändert (3,0 MINs/27 Patienten = 18,5% = + 7,1%); alle anderen Repeat-Typen waren seltener als die Mononukleotid Repeats betroffen. Sowohl die MIN Raten von komplexen Dinukleotid-Loci als auch von nicht komplexen Dinukleotid Loci unterschieden sich nicht signifikant von dem für die Gesamtheit aller Loci bestimmten Mittelwert (0,3 bzw. 0,9%). Ähnliches gilt für die Tetranukleotid-Repeats (+1,4%), die allerdings bezogen auf den jeweils einzelnen Locus eine starke Heterogenität aufwiesen (-11,4% bis + 14,5%). Liebhabte MIN-Frequenz wurde für beide Tetranukleotid Repeats ermittelt (+3,4%). Pentanukleotid Repeats zeigten dagegen unterdurchschnittliche MIN-Frequenzen (-4,0%). An einem Locus dieses Typs (HMFR2) wurde überhaupt keine MIN nachgewiesen. Daraus folgt, daß die Bestimmung der Frequenz von MIN-Ereignissen dramatisch von der Auswahl der analysierten Loci abhängig ist.

Bestimmte MTS Loci sind häufiger spezifisch in RER+ Tumoren verändert

Deshalb ist für die Analyse des MIN Status von Bedeutung, ob es bestimmte Loci gibt, die spezifisch und regelmäßig in RER+ Tumoren von MIN betroffen sind. Ein einheitliches Ergebnis wurde diesbezüglich nur bei MTS mit Mononukleotid Repeats erzielt (BAT 25, BAT 26, BAT 40). Jeder dieser Loci war in den gleichen 5 RER+ Tumoren verändert (Nrs. 1, 2, 8, 13, 16), aber keiner wies MIN in RER- Tumoren oder "lowMIN" Tumoren auf. Im Gegensatz dazu waren bis auf Mfd15 alle anderen getesteten Loci entweder weniger oft in den RER+ Tumoren mutiert oder zusätzlich in "lowMIN" Tumoren verändert. Beispielsweise konnte für den APC Locus nicht nur in allen RER+ Tumoren, sondern auch in Tumor Nr. 20 MTS nachgewiesen werden. Fünf Loci zeigten MINs in 4/6 RER+ Tumoren, aber nur D2S123 war in Nicht-RER+ Tumoren unverändert. Im Gegensatz dazu zeigte Locus MYCL1, der ebenfalls in 4/6 RER+ Tumoren verändert war, zusätzlich Instabilitäten in 3 "lowMIN" Tumoren, so daß beispielsweise dieser Locus als Marker ungeeignet ist.

Daher erfordert eine Beschränkung auf 5 Marker zur Analyse von Mikrosatelliteninstabilität eine gezielte Auswahl der Loci so daß dennoch gewährleistet ist, daß die Zahl der nicht eindeutig zu klassifizierenden lowMIN+ Fälle minimiert wird und alle RER+ Träger mit einem höheren Maß an Wahrscheinlichkeit identifiziert werden können.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 zeigt eine Tabelle mit den wichtigsten Kennzeichen der analysierten MTS Loci (Locussymbol, Markersymbol, chromosomale Lokalisation, Repeat-Typ) sowie den Parametern für die jeweilige PCR-Amplifikation (PCR-Tm: Hybridisierungstemperatur).

Abb. 2a zeigt die gelelektrophoretische Analyse von 25 untersuchten Mikrosatelliten Loci. Die verschiedenen Allele der erfundungsgemäß zu analysierenden Loci BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123 und TP53Alu lassen sich deutlich voneinander unterscheiden. Abb. 2b zeigt exemplarisch eine Duplexanslyse der Loci BAT40 und D3S1283 in einem Reaktionsansatz.

Abb. 3 stellt das Ergebnis der durchgeführten Studie in einer Übersicht dar. 27 Patienten mit Colorectal-Tumoren wurden auf MIN an 25 verschiedenen Allelen untersucht. Das Ergebnis zeigt, daß (i) unterschiedliche MTS in unterschiedlicher Häufigkeit von polymorphen Veränderungen betroffen sind und (ii) in unterschiedlichen Patienten verschiedene Klassen von Mikrosatelliten mit unterschiedlicher Häufigkeit von genomischer Instabilität betroffen sind.

Abb. 4 klassifiziert die Tumoren aus dem untersuchten Patientenkollektiv von 27 Personen nach der Anzahl der ermittelten MIN-Ereignisse.

Abb. 4a repräsentiert die Auswertung aller 25 MTS. Die Verteilung zeigt, daß eine Gruppe von 6 Patienten existiert, bei denen MIN häufiger als 7 mal auftritt, so daß dieser Klasse eindeutig der Phänotyp RER+ zugeordnet werden kann. Darüber hinaus existiert eine Gruppe von 8 Patienten, bei denen 1 oder 2 MIN nachgewiesen wurden und die damit als "lowMIN+" klassifiziert sind.

Abb. 4b repräsentiert die erfundungsgemäße Analyse von 5 ausgewählten MTS wie in Beispiel 1 beschrieben. Diese Analyse führt ebenfalls zu einer Verteilung, aufgrund derer eine eindeutige Entscheidung über den RER+ Phänotyps getroffen werden kann. Nur 2 Patienten (Nr. 7. TP53 Alu Locus und Nr. 20, APC Locus) müssen nach diesem Verfahren als lowMIN+ klassifiziert werden.

Abb. 4c repräsentiert die Analyse einer anderen erfundungsgemäßen Auswahl von 5 MTS gemäß Beispiel 2, die mit einer Ausnahme (APC, Patient 20) ebenfalls eine eindeutige Klassifikation des RER Phänotyps ermöglicht.

Abb. 5 zeigt Geburtsdatum, Alter und klinische Daten zum untersuchten Patientenkollektiv, Stand August 1994. (T, N; M: Tumorklassifikation, G: Grade, I.OK: Tumorklassifikation, re: Colon rechts, li: Colon links, R: Rectum).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiel 1: Auswahl von 2 Mononukleotid-Repeat Loci, 1 Dinukleotid-Repeat-Locus der Klasse 2a, 1 Dinukleotid Locus der Klasse 2b und 1 Pentanukleotid-Repeat Locus

Wie die Studie zeigte, ergaben sich bei der Verwendung von Mononukleotid Repeat Loci zur Bestimmung RER+ Phänotyps keine falsch-positiven Resultate, so daß eine Analyse dieser Loci besonders geeignet erschien. Außerdem

DE 197 12 332 A 1

konnten nicht alle RER+ Tumoren durch die Analyse von Mononukleotid Repeat Loci nachgewiesen werden. So war beispielsweise Tumor Nr. 5 eindeutig RER+, wies aber keine Instabilität bezüglich der Loci BAT2S, BAT26 und BAT40 auf, obwohl MIN an 9 Loci mit anderen Repeat Typen nachgewiesen werden konnten. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, für eine möglichst exakte Bestimmung des RER Phänotyps bei einer begrenzter Anzahl von 5 analysierten Loci eine Kombination aus verschiedenen Repeat Typen auszuwählen. Dadurch wird gewährleistet, daß trotz der geringen Zahl an analysierten Loci einerseits alle RER+ Träger mit einem höchst möglichen Maß an Wahrscheinlichkeit identifiziert werden können und andererseits die Zahl der nicht eindeutig zu klassifizierenden lowMIN+ Fälle soweit wie möglich minimiert wird.

Aufgrund der durch die Studie mit 27 Tumoren ermittelten Häufigkeiten wurde zur Bestimmung des Phänotyps folgende Kriterien festgelegt: bei mindestens 2 MIS-positiven Loci sollte von einem RER+ Phänotyp ausgegangen werden, bei keinem positiven Nachweis von MIS sollte von einem RER- Phänotyp ausgegangen werden. Der Nachweis von genau einem MIN Ereignis wurde als "low MIN+" definiert. (Letzteres erfordert im Zweifelsfalle die Analyse weiterer MIS Loci.)

Die Auswertung der 27 Tumoren bezüglich der erfundungsgemäß ausgewählten Loci BAI' 26, BAI' 40, APC, Mfd15, TPS3Alu nach diesem Verfahren führte zu dem in Abb. 4b dargestellten Ergebnis. Für alle 6 Tumoren die durch die Analyse von 25 Loci als RER+ klassifiziert worden waren, wurde eine Häufigkeit von mindestens drei MIN Ereignissen bestimmt. Somit wurden diese Tumoren auch durch die Analyse der 5 ausgewählten Loci als RER+ klassifiziert. Nur zwei Tumoren (Nr. 7, Nr. 20) wurden nach diesem Verfahren als "lowMIN+" klassifiziert und sind somit nicht eindeutig zu interpretieren.

Beispiel 2: Auswahl von 2 Mononukleotid-Repeat Loci, 1 Dinukleotid-Repeat-Locus der Klasse 2a und 2 Dinukleotid Loci der Klasse 2b

Die Auswertung der 27 Tumoren erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 1, jedoch mit einer modifizierten, ebenfalls erfundungsgemäßen MIS-Auswahl (BAI'26, BAI'40, APC, Mfd15 und D18S69). Das Ergebnis ist in Abb. 4c dargestellt. Sämtliche Tumoren mit RER+ Phänotyp waren in mindestens drei der ausgewählten Loci verändert. Somit konnten auch durch diese Auswahl an Loci alle 6 bekannten RER+ Tumoren eindeutig als RER+ identifiziert werden. Nur ein Tumor wurde in diesem Falle als "lowMIN+" und damit als nicht eindeutig interpretierbar klassifiziert.

Beispiel 3: Bestimmung des RER Phänotyps als prognostischer Indikator

Zum Nachweis der Eignung einer erfundungsgemäßen Auswahl von 5 Loci zur Bestimmung des RER Phänotyps wurden die in Abb. 5 tabellarisch enthaltenen klinischen Daten mit den Ergebnissen der MIN Analyse aus Beispiel 1 verglichen. Wie in diesem Beispiel offenbart, führte die Analyse der getesteten Loci zum Nachweis von RER+ bei 6 von insgesamt 27 untersuchten Tumorpatienten. Nur 2 von 6 (33%) dieser RER+ Patienten waren zum Abschluß der Studie verstorben. Beide waren zu diesem Zeitpunkt über 80 Jahre alt. Im Gegensatz dazu waren bereits 8 von 19 (42%) der in Beispiel 1 als RER- klassifizierten Patienten verstorben. Ihr Altersdurchschnitt hätte zum Zeitpunkt der Studie 64 Jahre betragen. Daraus ist ersichtlich, daß eine erfundungsgemäße Analyse von 5 Mikrosatelliten Loci eine prognostische Aussage über den Verlauf der Tumorerkrankung ermöglicht.

DE 197 12 332 A 1

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5 (i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
(B) STRASSE: Sandhoferstr. 116
(C) ORT: Mannheim
(E) LAND: DE
(F) POSTLEITZAHL: 68305
(G) TELEFON: 06217591456
(H) TELEFAX: 06217594457

10 15 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweis von
Mikrosatelliten-Instabilitaet zur Tumordiagnostik

20 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 50

25 (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

45 AAACAGGATG CCTGCCTTA

20

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

60 GGACTTTCCA CCTATGGGAC

20

60 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGCAGTACCA CCTGTAGAAA TC

22 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

20

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

25

GAGTAACAGA GGCATCGTGT ATTC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

40

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ACTCACTCTA GTGATAAAATC G

21

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

50

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

55

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGCAGATAAG ACAGTATTAC TAGTT

25 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

65

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

10 AGCTAAGTGA ACCTCATCTC TCTCT 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

25 ACCCTAGCAC TGATGGTATA GTCT 24

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
40 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

45 AACACTAGTG ACATTATTTT C 21

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
55 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

60 AGCTAGGCCT GAAGGCTTCT 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ACCACTGCAC TTCAGGTGAC

20 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GTGATACTGT CCTCAGGTCT CC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATGACAAGCA ATCCTTGAGC

20

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

50

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CTGTGTTATA TCCCTAAAGT GGTGA

25 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

65

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NC: 15:

10 CCCGTATGGC AACAGG

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NC: 16:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

TGTGCATGTC ATGAGTG

17

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NC: 17:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TATTGGATAAC TTGAATCTGC TG

22

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

60 TGCATCACCT CACATAGGTT A

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGAGAGAATCA AATACACAAT 20 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear 20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20: 25

GCTGGCCATA TATATATTTA AACCC 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear 35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21: 40

CAGGTTCTGT CATAAGGACTA 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear 55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22: 60

TTCTGGAAAC CTACTCCTGA 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare 65

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

10 CAGAAAATTC TCTCTGGCTA

20

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CTCATGTTCC TGGCAAGAAT

20

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 16 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

45 GCTCCCGGCT GGTTTT

16

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

60 GCAGGAAATTC GCAGGAACCTT

20

65 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKULS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

CTCTTTCTCT GACTCTGACC

20 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKULS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GACTTTCTAA GTTCTTGCCA G

21 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKULS: Genom-DNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

AGCGCACCAAC CTCCCCGGCCCC CAGTTT

26 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

GCTGCTGCTG CCTGGGGCTA GTCTCTT

27 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

65

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

10 TCGCCTCCAA GAATGTAAGT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

25 TCTGCATTTT AACTATGGCT C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

40 TGACTACTTT TGACTTCAGC C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

45 AACCAATTCAA CATTAAAC CC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

ATTAACCTTCC TACACCACAA C

5
21 1C

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

CTACAGCAAG ACCACCTTC

15
25
19
30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

CGGTTATCCC AGTCGGCCT CTCTGGGAT

29 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

TCCACCTCCC GCTCAGTCAG ACTGCGCT

55
40
28 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

65

DE 197 12 332 A 1

5 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

10 CCAGCTATAA TGACTAGAAT GAAGTCCTAC TG

32

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

TTGAATTAAA GACTTGTAA AACACAAAAT TTACAC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NC: 41:

TGGCGAGACT CCATCAAG

19

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

CTTTTTAAGC TGCAACAAATT TC

22

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

CTCCTCCCTA CTTACTTGT

19

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

65

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

AATTAACAAG GTGTGGTGG

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

20

GCACCTTCCT CAACTCTACA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

AACAGCTCCT TTAATGGCAG

20

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

55 AGGGATACTA TTCAGCCCGA GGTG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

60

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

65

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

ACTGCCACTC CTTGCCCCAT TC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

CCCACAGCCT ATTCAAGAAC A C

21

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

GTTGACTGCT GAACGGCTGC

20

40

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Mikrosatelliten-Loci, bestehend aus folgenden Schritten:
 - a) Isolierung von genetischer DNA aus humanem biologischem Material;
 - b) DNA-Amplifikation von 5 verschiedenen Mikrosatelliten-Loci der DNA mit Hilfe von jeweils fünf verschiedenen Primerpaaren, wobei es sich bei den zu amplifizierenden Loci um zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und gegebenenfalls ein Pentalukleotid-Repeat Locus handelt;
 - c) Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die 5 Mikrosatelliten-Loci ausgewählt werden aus einer Gruppe von Loci bestehend aus: BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69 und TPS3Alu.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die 5 Mikrosatelliten-Loci: BAT26, BAT40, APC, Mfd15 und D2S123 analysiert werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, und 36.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-5 zur Bestimmung des RER Phänotyps, dadurch gekennzeichnet, daß bei schlendem Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei allen 5 untersuchten Loci von einem RER Phänotyp und bei Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei mehr als einem Locus von einem RER+ Phänotyp ausgegangen wird.
7. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur prognostischen Tumordiagnose.
8. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Diagnose von familiärer Tumor-Prädisposition.
9. Verwendung gemäß Anspruch 7 oder 8 zur Indikation von Tumoren des Gastrointestinaleystems und des Endometriums.
10. Verwendung gemäß Anspruch 9 zur Indikation von Colorektalkarzinomen.
11. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von Mikrosa-

DE 197 12 332 A 1

telliten Instabilität in disseminierten Tumorzellen.

12. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Therapieentscheidung.

13. Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, mindestens bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und gegebenenfalls einem Pentanukleotid-Repeat Locus geeignet sind.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Locusymbol	PCR-Tm	Seq ID NO	Markername: Chrom. loc. Primersequenz	Mol. Fragmentlänge (bp)	Reference
D18S1236	60°	1	AFM0363	2p16 AAA CAG CAT GCC TGC CTT A	CA 197-227 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1237	60°	2	AFM1103-3	GG A CTT CCC ACC TAT CGG AC	CA 150-160 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1238	60°	3	AFM1103-3	GGC AGT ACC ACC TGT ASA AAT G	CA 150-160 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1239	60°	4	AFM1103-3	GGG TAA CAG AGC CAT CGG GAA TCC	CA 150-160 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1240	60°	5	LNS-CA1 (APC)	AGT CAG TGT AGT GAT TAA TCG	CA 96-122 Espino L., Nucl. Acids Res. 16: 6348 (1988)
D18S1241	60°	6	AFM1103-3a	AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T	CA 150-177 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1242 CA	60°	7	AFM1103-3a	AGC TAA GGC AGC CTC AGC TGT GCT T	CA 150-177 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1243 GT	60°	8	AFM1103-3a	ACC CTA CGC ACG ATC CTA TAC TCT	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1244	60°	9	AFM1103-3a	AAC ACT ATG GAC ATT ATT TC	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1245	60°	10	AFM1103-3a	AGC TAA CGC TGA AGG CGT CTC T	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1246	60°	11	AFM1103-3a	ACC ACT CGC ATC CAG GAC	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1247 CA	60°	12	AFM1103-3a	GTG ATA CGT TCC TCA CGT CGTC C	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1248 CA	58°	13	AFM1103-3	ATG AGC AGC ATT CCT TGC CC	CA 115-201 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1249 GT	60°	14	AFM1103-3	CTG TGT TAT ATC CGT AAA CGT GTC A	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1250	60°	15	AFM1103-3	CGC GIA TGG CGA CAG G	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1251	60°	16	AFM1103-3	TGT GCA TGT NCA TGA GTG	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1252	60°	17	AFM1103-3	TAT TGG ATG CTG GAA TCT CCT G	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1253	60°	18	AFM1103-3	TCC ATC ACC TCA CAT AGC TTA	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1254	60°	19	AFM1103-3	CGA AGT ATA AAG TAC AAT AAT	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1255	60°	20	AFM1103-3	GCT GGC CAT ATA TAT ATT AA ACC	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1256	58°	21	AFM1103-3	TAG GTC TGT GCA TAG GACT A	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1257	60°	22	AFM1103-3	TTC TGG AA CGT ACT CGT CCT GA	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1258	60°	23	AFM1103-3	TAG AAA ATTTC TCT TGC GAA	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1259	60°	24	AFM1103-3	CTC ATG TTC CTG CGA AGA AT	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1260	58°	25	AFM1103-3	GGT CCCC CGCT CGCT TTT	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1261	60°	26	AFM1103-3	CGAGGAATCGAGGAGCTT	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1262	60°	27	AFM1103-3	TTC TTT CGC TGA CTC TGA CC	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1263	60°	28	AFM1103-3	CAC TTT CTAG AGT TCT TGC CAG	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1264	71°	29	AFM1103-3	AGC AGA AGA CGT CCC GGC AGT TT	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1265	70°	30	AFM1103-3	CCT GCT GCG TGG GCG TAG TGT CTT	CA 142-156 Weissenbach, J. Natur 359:79-80; 1982
D18S1266	58°	31	BAT-231	TGG CCT CCA AGA ATG TA AGT	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1267	58°	32	BAT-231	TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1268	58°	33	BAT-281	TGA CTA CTT TGG ACT TCA AGC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1269	58°	34	BAT-281	AAC CAT TCA AGA TTT TAA CAC C	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1270	58°	35	BAT-401	ATT AAC TTT CTA CAC CAC AAC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1271	58°	36	BAT-401	GTA GAG CAA BAC CAC CTC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1272	58°	37	BAT-401	X	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1273	58°	38	FMR2-6	CGG TTA TCC CGC TCA GTC AGA CTG CGCT T	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1274	60°	39	HPR114	TCC ACC TCC CGC TCA GTC AGA CTG CGCT T	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1275	58°	40	HPR114	CGC TCT CGC ACT TAC TGT G	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1276	58°	41	MYCL1-U	TGT AAC TAA AGA CTT GTT TAA AGA CAA ATT TAA GAC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1277	58°	42	MYCL1-D	TGG CGA CAG TCC ATC AAG	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1278	58°	43	RBU	CIT TTT AGG CTG CGA CAG TIC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1279	58°	44	RBU	CTC CTC CGC ACT TAC TGT T	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1280	58°	45	1052Ab1	AAAT TAA CGA AGT GTC TGG	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1281	48°	46	1053Ab1	TGG AAC TCC TCA ACT CGT CA	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1282	47°	47	TFP31 PER31	AGC AGC ACT ATT CGG CGC GAG G	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1283	48°	48	TFP31	AGG GAT ACT ATT CGG CGC GAG G	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1284	49°	49	TFP4-1	ACT CGC ACT TAC CGC CGC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
D18S1285	50°	50	TFP4-4	CCG AGA GCC TAT TCA GAA CGC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817
				GTT GAC TGC TGA ACC GCT GC	CA 123-125 Papadopoulos, N. et al., Science 268:1815-1817

Abb. 1

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:
Int. Cl. 5:
Offenlegungstag:

DE 197 12 332 A1
C 12 Q 1/68
1. Oktober 1998

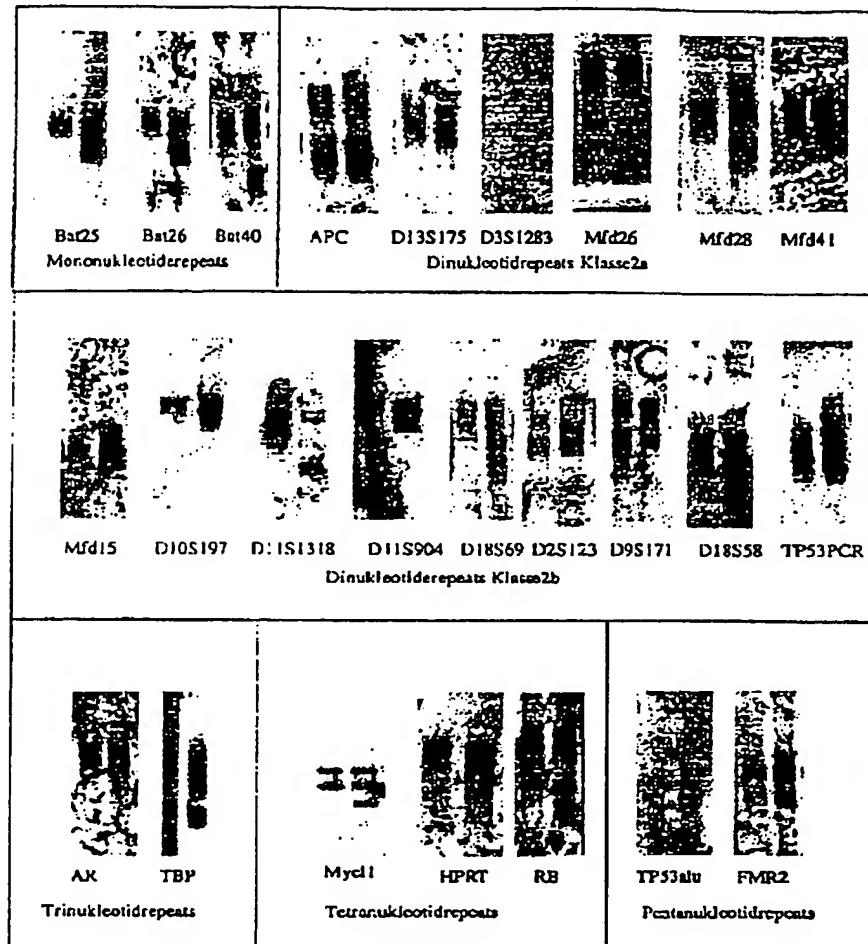


Abb. 2a

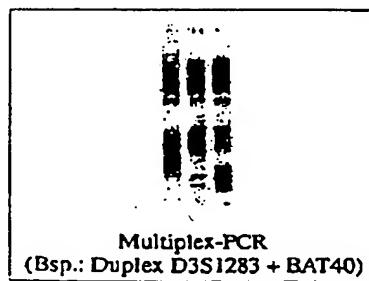


Abb. 2b

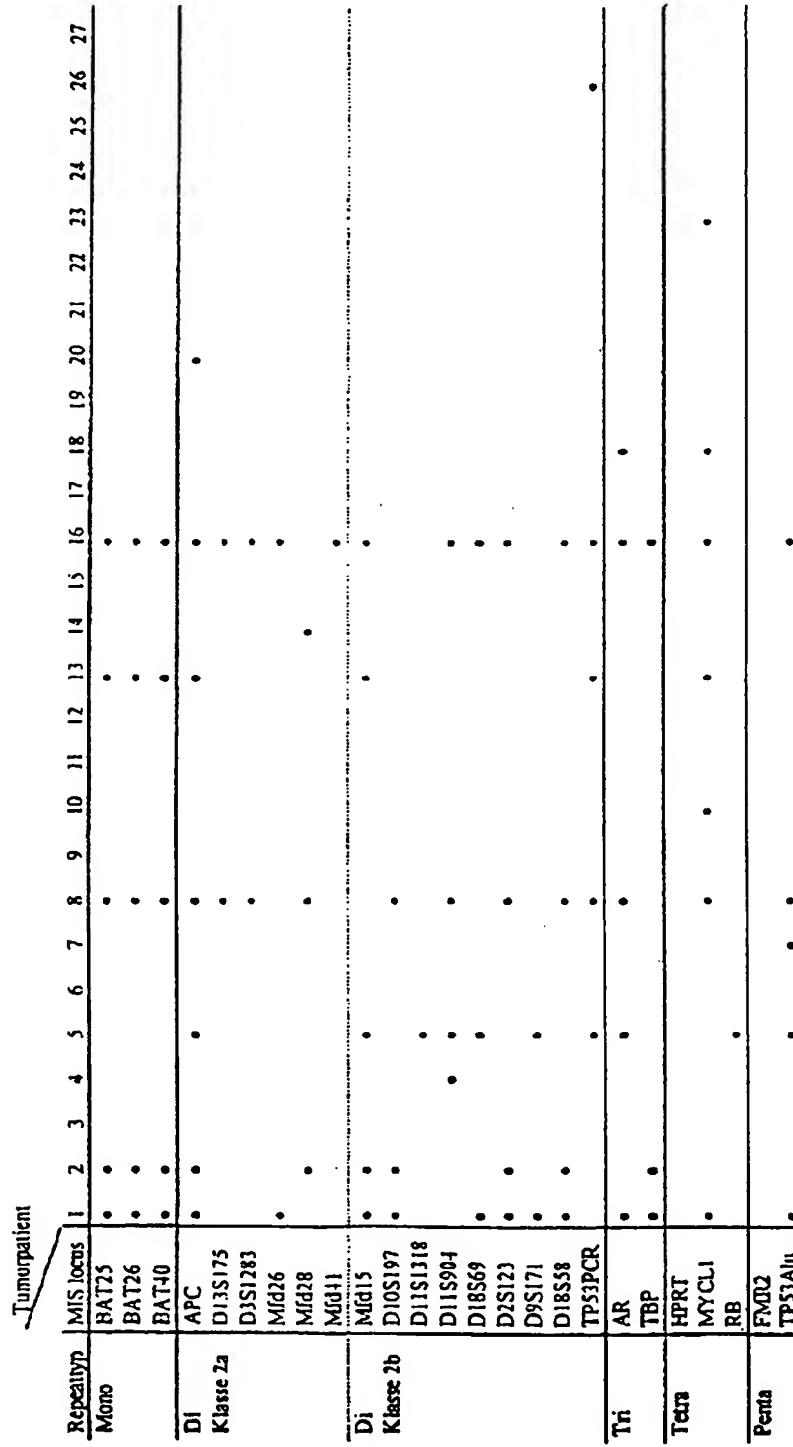


Abb. 3

n (tumors)

Abb. 4a

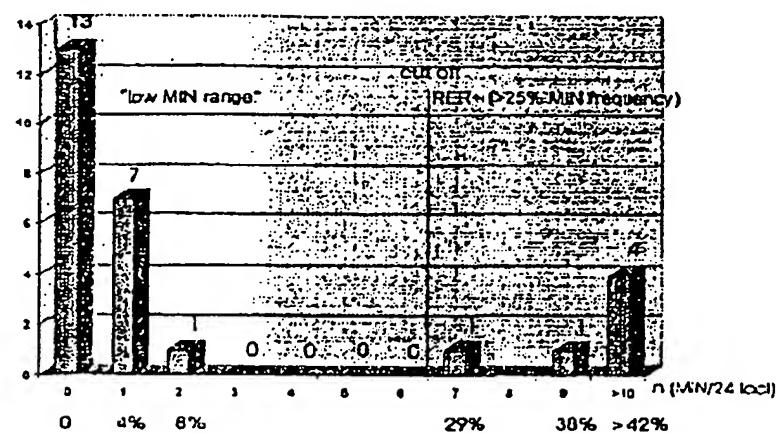


Abb. 4b

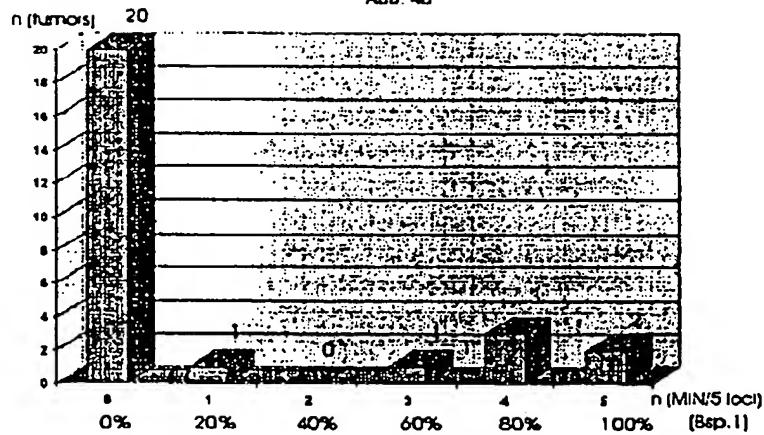
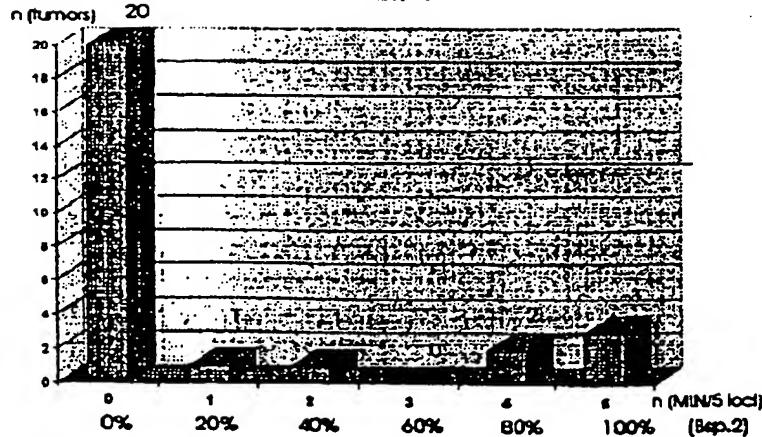


Abb. 4c



ZEICHNUNGEN SEITE 5

Nummer:

DE 197 12 332 A1

Int. Cl. 6:

C 12 Q 1/68

Offenlegungstag:

1. Oktober 1998

Patient	G.F.B	AGE	lebt	T	N	M	G	LOK	Klass. Bsp1
1	22.02.12	80	nein	4	3	X	3	re	RER+
2	23.01.49	44	ja	3	0	0	2	re	RER+
3	10.09.28	64	ja	2	0	0	2	R	RER-
4	09.02.19	74	ja	2	0	0	2	re	RER-
5	20.08.28	64	ja	3	1	X	3	R	RER+
6	04.06.29	64	nein	4	0	0	3	R	RER-
7	15.06.37	56	ja	3	0	1	2	R	lowMin+
8	25.11.24	70	ja	2	1	0	3	re	RER+
9	31.07.19	74	nein	4	0	0	3	R	RER-
10	22.06.29	64	nein	3	2	0	2	li	RER-
11	31.03.41	52	ja	0	0	0	2	R	RER-
12	30.04.46	47	ja	3	1	0	2	R	RER-
13	13.08.36	57	ja	3	1	0	3	re	RER+
14	03.09.28	65	ja	3	0	0	2	R	RER-
15	14.07.34	59	ja	1	0	0	2	R	RER-
16	22.07.09	84	nein	3	0	0	2	re	RER+
17	19.11.16	78	nein	3	2	X	2	R	RER-
18	13.03.50	44	ja	is	0	0	2	li	RER-
19	08.06.23	70	ja	2	0	0	2	R	RER-
20	01.07.37	57	nein	2	0	X	2	re	lowMin+
21	01.07.37	57	nein	3	2	0	3		RER-
22	03.06.33	60	nein	4	2	1	3	re	RER-
23	06.02.22	72	ja	is	0	0	2	re	RER-
24	30.10.35	59	nein	4	3	1	3	li	RER-
25	29.04.12	82	nein	3	3	1	2	R	RER-
26	17.07.21	73	ja	3	1	0	3	re	RER-
27	21.12.55	39	nein	3	2	1	3	R	RER-

Abb. 5